

اثر فعالیت کاهش یافته با لیگاتور بندی نخاع بر بیان CDK5 عصب سیاتیک و آزمون های رفتاری رت های نر ویستار دارای درد نروپاتیک

عبدالرضا کاظمی^{۱*}، مسعود رحمتی^۲، شیلا منتظر^۳

^۱گروه تربیت بدنی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران؛ ^۲گروه تربیت بدنی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران؛

^۳دانشجو، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱۶

چکیده:

زمینه و هدف: درد نروپاتیک به صورت درد ناشی از آسیب یا بیماری سیستم عصبی حسی- پیکری تعریف می شود. نوروں ها به کاهش و افزایش فعالیت به لحاظ بیوشیمیایی سازگار می شوند که چنین تغییرات بیوشیمیایی می تواند در حفظ و بقای نوروں ها اثر گذار باشد، با توجه به نقش تنظیمی کیناز وابسته به سایکلین- ۵ (CDK5) در عملکرد و ساختار اعصاب هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی تأثیر شش هفته فعالیت کاهش یافته به شکل درد نروپاتیک بر بیان CDK5 در عصب سیاتیک رت های نر دارای درد نروپاتیک بود.

روش بررسی: تعداد ۱۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزن $27/36 \pm 27/14$ گرم به ۲ گروه کنترل سالم ($n=5$) و گروه لیگاسیون عصب نخاعی ($n=5$) تقسیم شدند. طی ۶ هفته آینده آزمون های رفتاری درد نروپاتیک در گروه های پژوهشی به طور مستمر انجام شد. در پایان ۶ هفته تغییرات بیان ژن CDK5 در عصب سیاتیک با تکنیک Real time اندازه گیری و با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

یافته ها: پس از ۶ هفته وزن عضله نعلی در گروه لیگاتور بندی شده به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ($P \leq 0/05$). در آزمون های رفتاری درد نروپاتیک آلودنیای مکانیکی و هایپرآلژزیای حرارتی نشان داده شد. در گروه لیگاتور بندی آستانه تحریک درد نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کمتر بود ($P \leq 0/05$). میزان بیان ژن CDK5 در عصب سیاتیک در گروه لیگاتور بندی شده به طور معنی داری (پاتولوژیک) نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد ($P \leq 0/05$).

نتیجه گیری: به نظر می رسد در پی یک دوره فعالیت کاهش یافته با مدل لیگاسیون عصب نخاعی، افزایش پاتولوژیک بیان ژن CDK5 منجر به اثرات مخرب بر سیستم عصب و عضله و ظهور نشانه های پاتولوژیکی نظیر، آتروفی عضلانی، عصبی، تسریع روند آپوپتوز و تخریب عصبی می گردد.

واژه های کلیدی: درد نروپاتیک، فعالیت کاهش یافته، کیناز وابسته به سایکلین- ۵، رت ویستار و عصب سیاتیک.

مقدمه:

نروپاتی (Neuropathic Pain) یکی از شایع ترین علائم نروپاتی است که با خصوصیات نظیر پردردی (افزایش پاسخ به محرکی که در حالت طبیعی دردناک است) و آلودینیا (پاسخ به محرکی که در حالت طبیعی درد ایجاد نمی کند) مشخص می شود (۳). تغییر در سطوح مداخله گره های انتهایی نظیر نروتروفین ها و سایتوکاین ها با تغییر در فعالیت گیرنده ها و کانال های نوروں های درد

نروپاتی یکی از شناخته شده ترین امراض سیستم عصبی می باشد که با تغییرات ساختاری در اعصاب محیطی شامل آتروفی اکسون، میلین زدایی، کاهش تارهای عصبی، کاهش جریان خون عروقی- عصبی و کند شدن بازسازی تارهای عصبی همراه می باشد (۱) و می تواند منجر به علائمی از قبیل: درد و از دست دادن حس شود (۲). درد نروپاتیک

*نویسنده مسئول: رفسنجان- دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان- گروه تربیت بدنی- تلفن: ۰۹۱۳۳۹۸۲۷۰۶، E-mail: a.kazemi@vru.ac.ir

منجر به بروز علائم درد نوروپاتیک می گردد (۴). به طور کلی و اصلی ترین عامل درگیر در درد نورپاتی، آتروفی آکسونی و تار عصبی است (۳). کیناز وابسته به سایکلین-۵ یا (Cyclin Dependent Kinase= CDK5) یک کیناز ویژه از خانواده پروتئین کینازها است که به طور عمده در سیستم عصبی بیان می شود و نقش های مهم و برجسته ای در توسعه، بازسازی نورونی، اعمالی نظیر رها سازی نوروترانسمیترها (Neurotransmitters)، شکل پذیری (Plasticity)، آپوپتوز عصبی، رشد و جوانه زنی نورونی، سیگنالینگ درد و در نهایت وقوع امراض پاتولوژیکی سیستم عصبی نظیر نوروپاتی، دارد (۵-۹). مشخص شده است که فعالیت بیش از حد و یا عدم تنظیم فعالیت این کیناز در شرایط پاتولوژیک با افزایش بیش از حد فسفوریلاسیون منجر به روند افزایشی در تسریع آپوپتوز و تخریب عصبی می شود (۱۰). برخی از مداخله گرهای التهابی (نام برده شده) به عنوان تنظیم کننده های فعالیت CDK5 شناخته می شوند (۱۱) و در گام بعدی CDK5 از طریق مداخله در مکانیزم های مولکولی مختلف در سیگنالینگ درد اثر می گذارد (۹)؛ همچنین CDK5 از طریق تنظیم افزایشی و کاهش فعالیت مسیر کینازهای وابسته به سیگنال برون سلولی (Extracellular signal-regulated kinases) یا ERK1/2، فاکتور نکروز دهنده تومور یا TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) و سلول های PC12 به عنوان یک تنظیم کننده در سیگنالینگ درد شناخته می شود (۱۲). نشان داده شده است که بیان و در گام بعد فعالیت CDK5 در گانگلیون ریشه پشتی (Dorsal Root Ganglion) یا DRG و نخاع شوکی پس از التهاب محیطی به شکل پاتولوژیکی افزایش می یابد (۱۳)؛ همچنین نتایج آزمایشگاهی افزایش پاتولوژیکی سطوح mRNA و پروتئین CDK5 و به همان نسبت فعالیت این کیناز در نورون های درد (Nociceptive Neurons) را نشان دادند (۱۴). مطالعات در حیطه فیزیولوژی ورزش، به بررسی دوگانه سازگاری ناشی از فعالیت بدنی بر سیستم عصبی می پردازند: سازگاری های ناشی از فعالیت بدنی

افزایش یافته (که فعالیت های ورزشی مختلف در این حیطه جای می گیرند) و سازگاری های ناشی از فعالیت بدنی کاهش یافته: ادبیات نشان می دهد که نورون ها به افزایش فعالیت بدنی از طریق تغییر در برخی از ویژگی ها نظیر تغییر در بیان ژن، افزایش ستر پروتئین، افزایش انتقال آکسونی پاسخ داده و سازگار می شوند (۱۵، ۱۶) در واقع فعالیت افزایش یافته به شکل تمرین ورزشی بازسازی نورون ها را پس از آسیب آکسونی افزایش داده و بیان ژن پروتئین های مورد نیاز برای رشد و بازسازی آکسون را تحریک می کند (۱۶). فعالیت بدنی کاهش یافته (که در این حیطه، مباحث مربوط به فضانوردی و انواع بیماری ها مطرح است) مانند، مدل های حیوانی متعدد نظیر (Chronic Constriction Injury)، لیگاسیون عصب نخاعی یا (Spinal Nerve Ligation= SNL) و تزریق سیستمی استرپتوزوسین (STZ)، مربوط می شود که منجر به تسریع روند آپوپتوز، آتروفی و تخریب عصبی می گردد (۱۹-۱۶). از این رو، جهت مطالعه امراض پیش رو، نظیر درد نوروپاتیک، مورد استفاده قرار می گیرند. به طور کلی، با توجه به نقش تنظیمی CDK5 در عملکرد اعصاب و اختلال عملکرد ساختار اعصاب محیطی در نوروپاتی، این احتمال می رود که بیان CDK5 در شرایط فعالیت کاهش یافته با مدل SNL و به شکل درد نوروپاتیک دچار اختلال گردد؛ لذا هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر ۶ هفته فعالیت کاهش یافته با مدل SNL بر بیان ژن CDK5 در عصب سیاتیک رت های نروستار دارای درد نوروپاتیک می باشد.

روش بررسی:

تعداد ۱۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفته ای با میانگین وزنی $27/36 \pm 267/14$ (گرم) خریداری و در شرایط دمایی 22 ± 4 درجه سانتی گراد و تحت سیکل ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس نگهداری و با غذای مخصوص و آب تغذیه شدند. رت ها به دو گروه کنترل سالم ($n=5$) و گروه فعالیت کاهش یافته (SNL)

($n=5$) تقسیم و بر اساس وزن همسان سازی شدند. هر روز به وضعیت بهداشتی حیوانات رسیدگی می شد. در سراسر دوره پژوهش موش ها توسط دو نفر نیز جا به جا و دستکاری شدن. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. جهت لیگاسیون ابتدای رت ها با سدیم پنتوباریتول (۶۰ میلی گرم در هر کیلوگرم به صورت درون صفاقی) بیهوش شده و سپس عصب پنجم کمری نخاعی آن ها بر اساس روش کیم و چانگ به طور محکم گره زده شد (۱۸). به طور خلاصه، عضلات بین مهره ای در سطح مهره چهارم کمری و دوم خاجی جدا شده و زائده عرضی مهره ششم کمری برداشته شد. عصب پنجم کمری سمت چپ نخاع مشخص و با ظرافت از اعصاب مجاور جدا می گردید. عصب پنجم کمری به طور محکم با استفاده از نخ مخصوص (Thread silk)، دقیقاً در انتهای دیستال جهت اطمینان از ایجاد اختلال در تمام فیبرها گره زده شد؛ همچنین، جهت اجتناب از آسیب به عصب چهارم کمری، دقت بالایی مبذول می گردید. تنها حیواناتی در ادامه آزمایش لحاظ شدند که درد نوروپاتی را در آزمون های رفتاری نشان دادند (۱۸). به منظور سازگاری جهت آزمایش های رفتاری نیز حیوانات پیش از لیگاتور بندی نخاع به مدت ۳ روز در معرض آزمایشات رفتاری (۲ بار برای هر آزمایش) قرار گرفتند. بدین صورت که حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه رفتار درد، بدون اجرای واقعی آزمایش، به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در محیط اصلی آزمایش قرار می گرفتند (۲۰). سرانجام، به منظور ثبت اولیه میزان رفتارهای درد، پس از اجرای اولیه آزمون ها، عملیات لیگاتور بندی انجام شد. هر هفته پس از لیگاتور بندی (۲۰)، با اجرای مجدد آزمون های رفتاری درد و پس از اطمینان یافتن از وقوع درد نوروپاتیک، حیواناتی که پاسخ درد نوروپاتیک را در گروه لیگاسیون نشان دادند به عنوان آزمودنی در پژوهش در نظر گرفته شدند. تا پایان پژوهش آزمون های رفتاری به منظور تأیید وجود درد نوروپاتیک در آزمودنی ها هر هفته اجرا گردید.

به منظور اندازه گیری آلودینیای مکانیکی، حیوان بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی متر قرار گرفت. جهت عادت کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و بر روی صفحه مشبک قرار گرفتند. به منظور سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Ferry در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۶۰،۲۶،۱۵۸،۶،۴،۲) ساخت شرکت Stoltzing، USA جهت سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کمترین وزن شروع شد و در صورت عدم ایجاد پاسخ، به ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده گردید. چنانچه ۲ بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می گردید، همان وزنه به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه (PWT) ثبت شد و آزمون خاتمه یافت. چنانچه حیوان به هیچ یک از تارها، از جمله تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته شد؛ همچنین، هر آزمایش ۳ بار و به تناوب حداقل ۳ دقیقه تکرار شد و میانگین آن ها به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور گردید (۲۱). پردردی حرارتی با استفاده از روش Hargreaves و همکاران با کمی تغییر، مورد سنجش قرار گرفت (۲۲). به طور خلاصه، با استفاده از دستگاه Radiant Heat Plantar Test (Ugo Bassil, Italy) حیوانات در سه اتاقک از جنس پلکسی گلاس (طول ۲۲ cm × عرض ۲۲ cm × ارتفاع ۱۳/۳ cm) و بر روی یک صفحه پلکسی گلاس تمیز قرار گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه سازگاری حیوان با محیط جدید، با جابه جایی منبع متحرک تابش نور حرارتی، بخش میانی کف پای حیوان از میان سطح پلکسی گلاس در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار گرفت. پس از تابش نور حرارتی توسط دستگاه به کف پای حیوان، تایمر فعال شد و با کشیدن پا، تابش نور قطع و تایمر متوقف گردید و با ثبت زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (Paw Withdrawal Threshold) میزان تحمل حیوان نسبت به محرک آسیب رسان حرارتی مورد سنجش قرار گرفت. هر پا به طور متناوب و با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه،

برای ۳ بار آزمایش و میانگین آن ها به عنوان آستانه درد حرارتی ثبت شد؛ همچنین، جهت جلوگیری از آسیب بافت، نقطه نهایی آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. همچنین، میانگین سه اندازه گیری اولیه به عنوان تأخیر پایه در نظر گرفته شد (۲۳). در نهایت، پردردی حرارتی به عنوان درصد حداکثر اثر ممکن (MPE) با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردید:

(تأخیر پایه-زمان Cut Off)/(تأخیر پایه-تأخیر پس از لیگاتور بندی نخاع) $\times 100 = \%MPE$.

همچنین، میانگین سه اندازه گیری اولیه به عنوان تأخیر پایه در نظر گرفته شد. ۴۸ ساعت پس از پایان دوره ۶ هفته، رت ها توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی هوش و سگمنت های نخاعی تشکیل دهنده عصب سیاتیک (L6-L4) که در رت، میان دنده های T10-T12 (۲۵-۲۴ mm) قرار گرفته اند (۲۵،۲۴)، با برش در پایین ترین بخش ممکن بلافاصله استخراج شد؛ همچنین عضله نعلی در سمت چپ استخراج شد. پس از جداسازی کامل عضلات و بافت های پیوندی از استخوان درشت نی، طول بیشینه استخوان درشت نی توسط کولیس اندازه گیری شد، سپس به منظور نرمال سازی داده، توده عضلانی نسبت به طول درشت نی محاسبه شد. تمامی نمونه ها در نیتروژن مایع منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شدند. سنجش حدود ۵۰ میلی گرم بافت نخاع جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزا پروتئینی، محصول حاصل در ۴۰°C، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد، سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با

کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴۰°C، ۱۵ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴۰°C، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در Lμ20 آب RNase-Free RNA حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش قرار گرفت (Eppendorff, Germany) و نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از ۱ μg RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Reverse transcriptase Mmulv انجام گرفت. اندازه گیری سطوح بیان CDK5 mRNA از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام شد (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی Lμ20 و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن های CDK5 و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

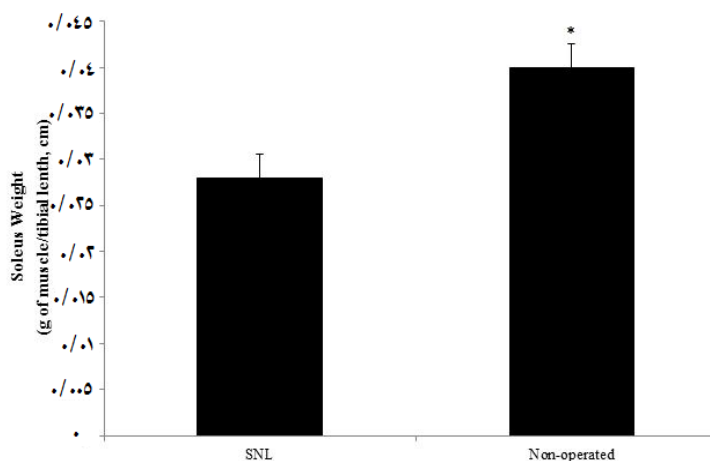
Genes	Primer sequence	GenBank code
CDK5	For: 5'- GGC TTCATGATGTCCTGCATAG-3	NM_080885
	'Rev: 5'- GAC AGA ATC CCA GGC CTT TC -3'	
GAPDH	For: 5'- GACATGCCGCCTGGAGAAAC -3'	NM_017008
	Rev: 5'- AGCCAGGATGCCCTTTAGT -3'	

با استفاده از نرم افزارها SPSS انجام و سطح معنی داری ۰/۰۵ ($\alpha < 0/05$) در نظر گرفته شد.

یافته ها:

در پایان ۶ هفته در گروه لیگاتور بندی (SNL) وزن عضله نعلی (نسبت به طول درشت نی) نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش پیدا کرده بود ($P=0/007$) (نمودار شماره ۱).

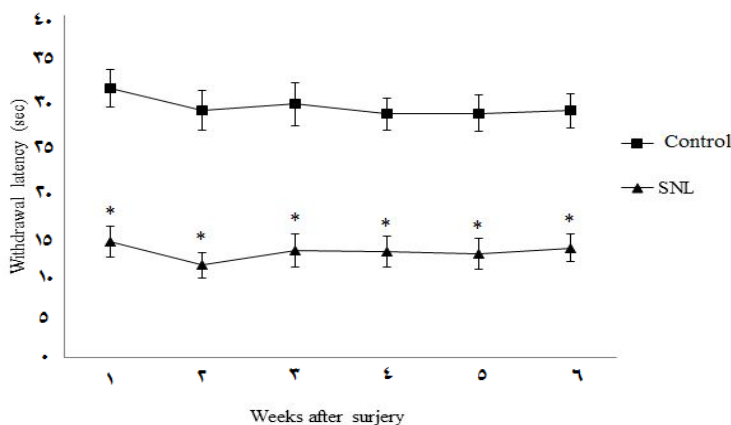
مفروضه های استفاده از آمار پارامتریک شامل طبیعی بودن توزیع داده ها و تجانس واریانس ها به ترتیب با استفاده از آزمون های کولموگروف اسمیرنوف (KS) و لوین مورد آزمون قرار گرفت. پس از احراز این مفروضه ها، جهت تعیین معنی داری تفاوت بیان ژن CDK5 از آزمون T و برای بررسی تفاوت دو گروه در آزمون های رفتاری از آزمون تحلیل واریانس با اندازه های تکراری استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده ها



نمودار شماره ۱: تغییرات وزن عضله نعلی در پایان ۶ هفته لیگاسیون، (*کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل)

زودتر نسبت به گروه کنترل واکنش نشان دادند ($P=0/013$) (نمودار شماره ۲).

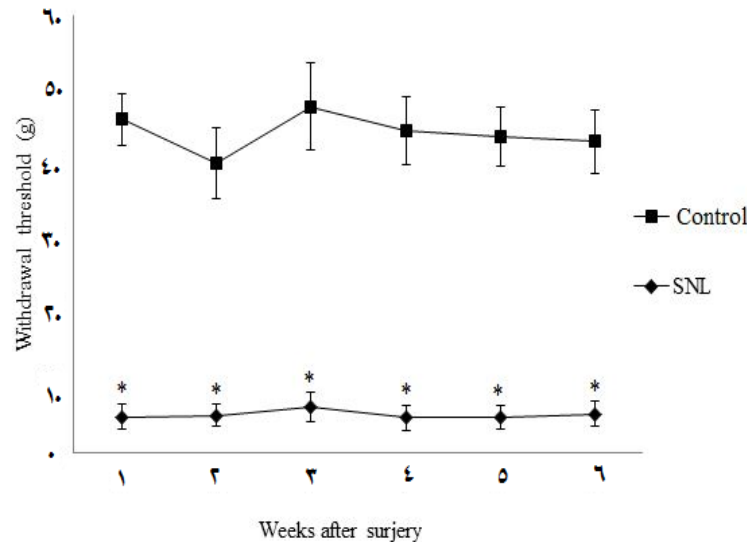
در طول ۶ هفته گروه لیگاتور بندی (SNL) در پس کشیدن پا (هایپرآلژزیای حرارتی) به طور معنی داری



نمودار شماره ۲: تغییرات درد نوروپاتیک (هایپرآلژزیای حرارتی)، (*کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل)

معنی داری زودتر نسبت به گروه کنترل واکنش نشان دادند ($P=0/0087$) (نمودار شماره ۳).

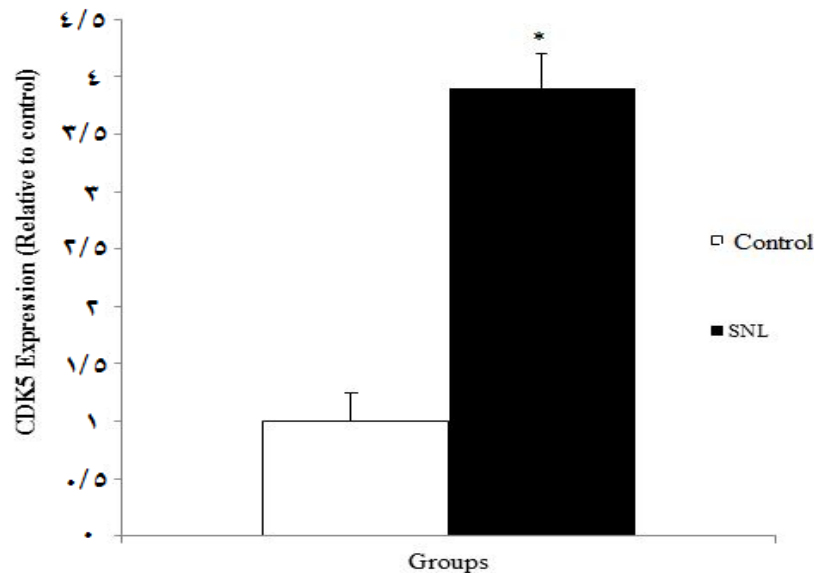
در طول ۶ هفته گروه لیگاتور بندی (SNL) در آستانه تحریک درد پا (آلودنیای مکانیکی) به طور



نمودار شماره ۳: تغییرات درد نوروپاتیک (آلودنیای مکانیکی)، (*کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل)

معنی داری افزایش نشان داده بود ($P=0/0019$) (نمودار شماره ۴).

در پایان ۶ هفته بیان ژن CDK5 در گروه لیگاتور بندی (SNL) نسبت به گروه کنترل به طور



نمودار شماره ۴: تغییرات بیان ژن CDK5، (*افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل)

بحث:

دوره ۶ هفته ایی در عصب سیاتیک رت های نر ویستار مبتلا به درد نوروپاتیک، مورد بررسی قرار داد؛ همچنین

پژوهش حاضر با استفاده از مدل SNL به عنوان فعالیت کاهش یافته تغییرات بیان ژن CDK5 را پس از یک

شاخص های دیگر مربوط به پژوهش نظیر وزن عضله و همچنین آزمون های رفتاری درد نوروپاتی آلودنیای مکانیکی و هایپر آلژزیای حرارتی نیز اندازه گیری شد. آتروفی عضلانی به دلیل عدم استفاده طولانی مدت از عضله و به دلایل مختلفی رخ می دهد، در فضاوردانی که دور از جاذبه زمین هستند (۲۶) و همچنین عوامل پاتولوژیکی نظیر کاهش خونرسانی، تغذیه ناکافی، قطع عصب یک عضله (آتروفی نوروژنیک) از دلایل آتروفی عضلانی نیز نامبرده شده اند (۲۷). در پژوهش های پیشین نشان داده شد است که عوامل پاتولوژیکی منجر به آتروفی عضلانی می شود. Bodine-Fowler و همکاران کاهش وزن عضله نعلی در پی ۴ هفته بستن عصب سیاتیک در رت های ماده را مشاهده کردند (۲۸). Sacheck نشان داد، آسیب به عصب منجر به آتروفی عضلانی در عضلات متعاقب آن عصب می شود (۲۹)؛ همچنین Riley و همکاران کاهش وزن عضلات درشت نی قدامی و نعلی در پی کاهش جریان خون و قطع اعصاب نشان دادند (۳۰). مطابق پژوهش های پیشین در پژوهش حاضر قطع عصب رسانی با مدل SNL در پی ۶ هفته منجر به کاهش معنی دار وزن عضله نعلی گردید که دلایلی نظیر کاهش محتوای آنزیمی و کاهش تارهای عضلانی متعاقب یک دوره بی تحرکی را می توان از عوامل موثر نام برد (۳۱). مطالعات بسیاری نشان داده اند که مدل های درد نوروپاتیکی با اختلالات ساختاری و عملکردی سلول های عصبی همراه بوده است (۳۲). مدل لیگاتور بندی عصب L5 کمری (SNL) منجر به آتروفی آکسونی و تارهای عصبی پایین دست می شود که به عنوان علائم اصلی در ظهور درد نوروپاتیکی شناخته شده است (۳۳، ۱۹). در پژوهش حاضر با استفاده از آزمون های رفتاری نشان داده شد که در اثر لیگاتور بندی یا همان مدل SNL به عنوان مدل فعالیت کاهش یافته منجر به ظهور درد نوروپاتیکی گردید. می توان گفت با توجه به ادبیات بیان شده فعالیت کاهش یافته و افزایش یافته به نوعی دو اثر متضاد را بر

ساختار نورونی و در پی آن درد نوروپاتیکی را دارا می باشند. به طوری که Sharma و همکاران اثر ۳ هفته تمرین هوازی ملایم، همچنین Rossi و همکاران اثر ۸ هفته تمرین شنا را به عنوان فعالیت افزایش یافته بر بهبود پردردی مکانیکی نشان دادند (۳۴، ۲۰). این موارد نشان می دهند فعالیت افزایش یافته به شکل تمرین ورزشی بر بهبود درد نوروپاتیکی موثر می باشد که متضاد موارد نام برده شده در فعالیت کاهش یافته در ظهور درد نوروپاتیکی می باشد، لذا نتایج پژوهش حاضر می تواند نتایج ارزشمندی را در اهمیت فعالیت ورزشی در بهبود درد نوروپاتیکی نشان دهد. کاهش و افزایش نابجای بیان و فعالیت CDK5 به نوعی از عوامل اصلی راه اندازی مسیرهای رشد و یا مرگ نورون ها در سیستم عصبی مرکزی می باشد (۵). بر اساس مبانی نظری بیان ژن CDK5 در شرایط پاتولوژیکی و تخریب عصبی نظیر نوروپاتی می بایست با یک افزایش پاتولوژیکی و چشمگیر همراه باشد (۱۰) که در پی آن افزایش فسفوریلاسیون در نوروفیلان ها و همچنین در مسیرهای سیگنالینگ بالارفته و موجب فراهم آوردن شرایط پاتولوژیکی، آتروفی عصبی، تسریع آپوپتوز و در نهایت برهم خوردن نظم و تعادل رشد و جوانه زنی و مرگ نورون ها می شود (۸). در پژوهش حاضر نشان داده شد که در پایان ۶ هفته بیان ژن CDK5 در گروه SNL به طور معنی داری و پاتولوژیکی نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد. پیش از این Cruz and Tsai عدم تنظیم فعالیت و بیان CDK5 را در بیماری تخریب عصبی آلزایمر و همچنین کشاورز و همکاران افزایش پاتولوژیکی بیان ژن CDK5 را در پی تزریق STZ در ظهور شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت مشاهده کردند (۳۶، ۳۵). با توجه به این که مدل لیگاتور بندی عصب L5 کمری (SNL) منجر به آتروفی آکسونی و ظهور شرایط تخریب عصبی اعصاب پایین دست می شود (۳۳). نتایج ما برای میزان بیان ژن CDK5 مطابق انتظار بود و احتمال می رود افزایش پاتولوژیکی بیان ژن این کیناز منجر به ظهور شرایط فوق گردید. در باب نقش CDK5 و درد نوروپاتیکی در سال ۲۰۰۶ اولین بار

نقش انکار ناپذیر CDK5 در سیستم عصبی محیطی (Peripheral Nerve System) و عملکرد ضروری آن در مسیر سیگنالینگ درد نشان داده شد (۱۴). پژوهش های پیشین نشان دادن که بیان و در گام بعد فعالیت CDK5 در اعصاب مرکزی و محیطی و نخاع پس از التهاب محیطی به شکل پاتولوژیکی افزایش می یابد (۱۳)؛ همچنین نتایج آزمایشگاهی نشان دادند افزایش پاتولوژیکی سطوح mRNA و پروتئین CDK5 و به همان نسبت فعالیت این کیناز در نورون های درد نشان دادند (۱۳). در پژوهش حاضر همان گونه که انتظار می رفت مشخص شد که ظهور درد نوروپاتیکی در گروه SNL در آزمون های رفتاری همسو با افزایش پاتولوژیکی بیان ژن CDK5 بود. که با توجه به مبانی نظری فرق مبنی بر عدم تعادل در کارکرد CDK5 و پیامدهای آن از جمله بروز درد نوروپاتیک، منجر به ظهور درد نوروپاتیک در گروه آزمودنی مورد نظر شد.

پی فعالیت کاهش یافته شکل می گیرد. به طور کلی مشخص گردید که با افزایش پاتولوژیکی بیان ژن CDK5 به عنوان یک کیناز کلیدی و تنظیم کننده در رشد نورون ها و کارکرد آن ها، این افزایش منجر به تسریع عوارض مخرب در پی یک دوره فعالیت کاهش یافته با مدل SNL می شود که در این جا به نظر می رسد فواید فعالیت افزایش یافته (ورزشی) بیش از پیش مشخص می گردد. به طور کلی در پژوهش حاضر مشخص شد که فعالیت کاهش یافته به شکل SNL می تواند با اثرات مخرب عصبی همچون پردردی، آلودینیا و افزایش بیان ژن CDK5 همراه باشد. در این جا به نظر می رسد فعالیت بدنی افزایش یافته به شکل تمرینات استقامتی و قدرتی بتواند از تخریب عصب و اختلالات وابسته به آن جلوگیری کند، با این حال تأیید این فرضیه مطالعات گسترده ای در این رابطه می باشد.

تشکر و قدردانی:

مطالعه حاضر حاصل طرح پژوهشی به شماره ۳/۲۶۹۱ مصوب دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان در تاریخ ۹۳/۱/۱۶ و پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی می باشد. نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه ولی عصر (عج) به دلیل حمایت مالی و از آزمایشگاه گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل استفاده از امکانات آزمایشگاهی ابراز می دارند.

نتیجه گیری:

با توجه به پژوهش حاضر مشخص شد که فعالیت کاهش یافته با مدل SNL می تواند در مبحث عصبی و عضلانی با اثرات مخرب بر هر دوی عصب و عضله، منجر به ظهور عواملی نظیر، آتروفی عضلانی، عصبی، تسریع روند آپوپتوز و تخریب عصبی گردد؛ همچنین نشان داده شد که ظهور درد نوروپاتیک به عنوان عاملی مهم و مورد بررسی در جوامع امروزی در

منابع:

1. Duby JJ, Campbell RK, Setter SM, White JR, Rasmussen KA. Diabetic neuropathy: an intensive review. Am J Health Syst Pharm. 2004; 61(2): 160-73; quiz 75-6.
2. Saad M, Tafani C, Psimaras D, Ricard D. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in the adult. Curr Opin Oncol. 2014; 26(6): 634-41.
3. Cunha JM, Funez MI, Cunha FQ, Parada CA, Ferreira SH. Streptozotocin-induced mechanical hypernociception is not dependent on hyperglycemia. Braz J Med Biol Res. 2009; 42(2): 197-206.
4. Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. Brain Res Rev. 2006; 51(2): 240-64.

5. Contreras-Vallejos E, Utreras E, Gonzalez-Billault C. Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5. *Cell Signal*. 2012; 24(1): 44-52.
6. Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, Kulkarni AB, Tsai LH, Gleeson JG. Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron*. 2004; 41(2): 215-27.
7. Shelton SB, Johnson GV. Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. *J Neurochem*. 2004; 88(6): 1313-26.
8. Nancy Y, Ip I, Li-Huei T. Cyclin dependent kinase 5 (CDK5). 1st ed. Springer; 2008.
9. Utreras E, Futatsugi A, Pareek TK, Kulkarni AB. Molecular Roles of Cdk5 in Pain Signaling. *Drug Discov Today Ther Strateg*. 2009; 6(3): 105-11.
10. Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol*. 2012; 22(3): 169-75.
11. Kanungo J, Zheng YL, Amin ND, Pant HC. Targeting Cdk5 activity in neuronal degeneration and regeneration. *Cell Mol Neurobiol*. 2009; 29(8): 1073-80.
12. Bogen O, Joseph EK, Chen X, Levine JD. GDNF hyperalgesia is mediated by PLCgamma, MAPK/ERK, PI3K, CDK5 and Src family kinase signaling and dependent on the IB4-binding protein versican. *Eur J Neurosci*. 2008; 28(1): 12-9.
13. Utreras E, Terse A, Keller J, Iadarola MJ, Kulkarni AB. Resveratrol inhibits Cdk5 activity through regulation of p35 expression. *Mol Pain*. 2011; 7: 49.
14. Pareek TK, Kulkarni AB. Cdk5: a new player in pain signaling. *Cell Cycle*. 2006; 5(6): 585-8.
15. Choe MA, Kim KH, An GJ, Lee KS, Heitkemper M. Hindlimb muscle atrophy occurs from peripheral nerve damage in a rat neuropathic pain model. *Biol Res Nurs*. 2011; 13(1): 44-54.
16. Gardiner P. Advanced neuromuscular exercise physiology. *Human Kinetics*. 2011; 1: 98.
17. Bennett GJ, Xie Y-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988; 33(1): 87-107.
18. LaBuda CJ, Little PJ. Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J Neurosci Methods*. 2005; 144(2): 175-81.
19. Rahmati M, Khazani A, Gharakhanlou R, Movaheddin M, Manaheji H. Chronic effects of moderate intensity endurance training on neuropathic pain symptoms in diabetic rats. *Physiol Pharmacol*. 2013; 16(4): 435-45.
20. Sharma NK, Ryals JM, Gajewski BJ, Wright DE. Aerobic exercise alters analgesia and neurotrophin-3 synthesis in an animal model of chronic widespread pain. *Phys Ther*. 2010; 90(5): 714-25.
21. Calcutt NA, Jorge MC, Yaksh TL, Chaplan SR. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain*. 1996; 68(2-3): 293-9.
22. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988; 32(1): 77-88.
23. Stagg NJ, Mata HP, Ibrahim MM, Henriksen EJ, Porreca F, Vanderah TW, et al. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology*. 2011; 114(4): 940-8.
24. Prodanov D, Feirabend HK. Morphometric analysis of the fiber populations of the rat sciatic nerve, its spinal roots, and its major branches. *J Comp Neurol*. 2007; 503(1): 85-100.
25. Liu S, Brejot T, Cressant A, Bacci J, Said G, Tadie M, et al. Reinnervation of hind limb extremity after lumbar dorsal root ganglion injury. *Exp Neurol*. 2005; 196(2): 401-12.
26. Hodges P, Holm AK, Hansson T, Holm S. Rapid atrophy of the lumbar multifidus follows experimental disc or nerve root injury. *Spine*. 2006; 31(25): 2926-33.

27. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(5): E1.
28. Bodine-Fowler SC, Allsing S, Botte MJ. Time course of muscle atrophy and recovery following a phenol-induced nerve block. *Muscle Nerve*. 1996; 19(4): 497-504.
29. Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J*. 2007; 21(1): 140-55.
30. Riley DA, Ilyina-Kakueva EI, Ellis S, Bain JL, Slocum GR, Sedlak FR. Skeletal muscle fiber, nerve, and blood vessel breakdown in space-flown rats. *FASEB J*. 1990; 4(1): 84-91.
31. Antonutto G, Capelli C, Girardis M, Zamparo P, Di Prampero P. Effects of microgravity on maximal power of lower limbs during very short efforts in humans. *J Appl Physiol*. 1999; 86(1): 85-92.
32. Moes JR, Holden JE. Characterizing activity and muscle atrophy changes in rats with neuropathic pain: a pilot study. *Biol Res Nurs*. 2014; 16(1): 16-22.
33. Liu X, Eschenfelder S, Blenk KH, Janig W, Habler H. Spontaneous activity of axotomized afferent neurons after L5 spinal nerve injury in rats. *Pain*. 2000; 84(2-3): 309-18.
34. Rossi DM, Valenti VE, Navega MT. Exercise training attenuates acute hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic female rats. *Clinics*. 2011; 66(9): 1615-9.
35. Cruz JC, Tsai LH. Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 10(9): 452-8.
36. Keshavarz M, Gharakhankou R, Movaheddin M, Baghersad L, Dakhili A, khazani A. The effect of endurance training on gene expression of cdk5 in spinal motor part of male wistar rats with diabetic neuropathy. *Iran J Diabetes Metab*. 2014; 13(4): 287-296.

The effect of decreased activity in the form of spinal cord ligation on CDK5 expression in sciatic nerve and behavioral test of Wistar male rats with neuropathic pain

Kazemi A^{1*}, Rahmati M², Montazer Sh³

¹Physical Education Dept., Vali-E-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, I.R. Iran; ²Physical Education Dept., Lorestan University, Khoramabad, I.R. Iran; ³Student, Exercise Physiology, Dept., Islamic Azad University of Kerman, Kerman, I.R. Iran.

Received: 13/Oct/2014 Accepted: 7/Jul/2015

Background and aims: Neuropathic pain has defined as pain resulting from injury or disease of the somatosensory nervous system. Neurons biochemically are adjusted to reduction and increased in activity, that this Biochemical changes could affect the maintenance and survival of neurons. With regard to regulatory role of Cdk5 in the function and structure of the nervous, the aim of this study was to evaluate effect of 6 weeks decreased activity in the form of spinal cord ligation on CDK5 expression in sciatic nerve of Wistar male rats with neuropathic pain.

Methods: 10 adult male Wistar rats in the weight range of 267.14 ± 27.36 g were divided into 2 groups including healthy control (C), ligation (SNL). Over the six weeks neuropathic pain behavior tests were conducted continually in groups. In the end change of CDK5 gene expression in sciatic nerve was measured with Real time technique and calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Results: After 6 weeks Soleus muscle weight significantly decreased in ligation group compared to control group ($P < 0.05$). In the behavioral tests of neuropathic pain was shown pain threshold was significantly lower than in ligation group compare to control group ($P < 0.05$). CDK5 gene expression in sciatic nerve increased significantly (pathologically) in ligation group related to control group ($P < 0.05$).

Conclusion: It seems that after a period of decreased activity in the form of spinal cord ligation, pathological Increase of CDK5 gene expression can lead to destructive effect on the neuromuscular system and emerge of pathological markers such as neuromuscular atrophy, acceleration of apoptosis and neurodegenerative destruction.

Keywords: Neuropathic pain, Decreased activity, Cdk5, Wistar rats, Sciatic nerve.

Cite this article as: Kazemi A, Rahmati M, Montazer SH. The effect of decreased activity in the form of spinal cord ligation on CDK5 expression in sciatic nerve and behavioral test of Wistar male rats with neuropathic pain. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 17(6): 22-32.

***Corresponding author:**

Physical Education Dept., Vali-E-ASR University of Rafsanjan, Rafsanjan, I.R. Iran,
Tel: 00989133982706, E-mail: a.kazemi@vru.ac.ir